



Hapten induces ATP release from keratinocytes through the opening of the pannexin hemichannels by reactive oxygen species

著者	大浪 薫
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第15438号
URL	http://hdl.handle.net/10097/58387

博士論文

**Hapten induces ATP release from keratinocytes through the opening of the
pannexin hemichannels by reactive oxygen species**
(表皮角化細胞のハプテン刺激における細胞外 ATP 放出の機序について)

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻
神経・感覚器病態学講座 皮膚科学分野
大浪 薫

接触皮膚炎はアレルギー性接触皮膚炎と刺激性接触皮膚炎に分類される。前者ではアレルゲンに感作されるには自然免疫を担う樹状細胞が活性化される必要がある。細胞外 ATP は damage-associated molecular patterns (DAMPs) の 1 つで、ATP の受容体である P2X7 受容体とともに樹状細胞を成熟させ、アレルギー性接触皮膚炎を誘導すると考えられている。この論文では感作物質であるハプテンを表皮角化細胞に添加後、細胞外 ATP 放出の有無やその機序について明らかにするため実験を行った。我々は、ヒト表皮角化細胞由来の HaCaT 細胞にハプテン (DNFB、4-NBB、NiCl₂) および一次刺激物質 (SDS、LA) を添加し、ATP の細胞外への放出の他、propidium iodide (PI) 透過性、LDH の細胞外への放出、ROS、ミトコンドリア由来のスーパーオキシドアニオンの産生、チオール化合物の N-アセチルシステインおよびその他の抗酸化剤によるそれらの影響を解析した。細胞死は PI の透過性、LDH、ATP の細胞外放出によって評価した。

我々はまず始めにハプテン (DNFB、4-NBB) と一次刺激物質 (SDS、LA) に暴露された HaCaT 細胞における細胞死および細胞外 ATP 放出の時間動特性が異なることを見出した。ハプテンにおいては HaCaT 細胞添加 6 時間後に PI 透過性が生じ、9 時間から 12 時間後にかけて遅延性に細胞外 ATP の放出量が増加した。それに対し、一次刺激物質では HaCaT 細胞添加 1 時間後に PI 透過性が生じ、同時間に細胞外 ATP の放出量が増加し、その後細胞外 ATP の放出量は減少した。次にチオール化合物の N-アセチルシステインを前処理すると、ハプテンによる HaCaT 細胞の PI 透過性を抑制することができたが、一次刺激物質による刺激では PI の透過性は抑制されないことが明らかになった。これらの結果から、ハプテンは一次刺激物質と異なり表皮角化細胞のチオール基に特異的に反応し細胞死を引き起こす可能性を示した。

さらに HaCaT 細胞に代表的なハプテン (DNFB、4-NBB、DPCP) を添加すると ROS およびミトコンドリア由来のスーパーオキシドアニオンの産生がみられた。ハプテン (DNFB、4-NBB、DPCP) 添加後の HaCaT 細胞における ROS の産生は N-アセチルシステインの他、抗酸化剤 (TEMPOL、MnTBAP、Apocynin) を前処理することにより抑制することができた。

そしてこれらの抗酸化剤（TEMPOL、MnTBAP、Apocynin）を前処理後、ハプテン（DNCB、4-NBB、DPCP）添加後の HaCaT 細胞における LDH、ATP の細胞外放出を評価したところ、細胞外へ放出される LDH および ATP は抑制された。しかし HaCaT 細胞の PI 透過性は抑制しなかった。

抗酸化剤（TEMPOL、MnTBAP、Apocynin）を前処理後 ATP の細胞外の放出が抑制されたため、ROS が ATP を細胞外へ放出する役割を担っていることが示唆された。

さらに、pannexin hemichannels の阻害剤のひとつである Carbenoxolone を HaCaT 細胞に前処理したところ、ハプテン処理した HaCaT 細胞による細胞外 ATP の放出は抑制された。Probenecid、Panx-1 mimetic blocking peptide を HaCaT 細胞に前処理後も同様の結果が得られた。これらの結果は、ハプテン添加後の HaCaT 細胞において pannexin hemichannels が開孔されることにより、細胞外 ATP が放出されることを示した。

この論文で、ハプテンは表皮角化細胞のチオール基に特異的に反応し、HaCaT 細胞の膜統合性を壊し細胞死を誘導すること、一方で ROS の産生を介して pannexin hemichannels を開孔することにより細胞外 ATP の放出が生じることが示された。